

乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 试剂盒说明书

(货号: G0929F 分光法 24 样)

一、产品简介:

乙酰胆碱转移酶(Choline acetyltransferase ChAT, EC 2.3.1.6) 是乙酰胆碱 Ach 的合成酶, 调节 Ach 的代谢。Ach 是调节食道平滑肌运动的主要的兴奋性神经递质。

ChAT 的测定是以乙酰辅酶 A 和胆碱为底物, 在 ChAT 的作用下, 反应的生成乙酰胆碱和辅酶 A, 该产物和显色剂反应于 412nm 处有吸收峰, 进而计算出 ChAT 的活力。

酶催化反应方程式: $\text{acetyl-CoA} + \text{choline} = \text{CoA} + \text{O-acetylcholine}$ 。

二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|----------|--|
| 提取液 | 液体 30mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 mg×1 支 | -20°C 保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解备用, -20°C 保存 |
| 试剂二 | 粉体 mg×1 支 | 4°C 保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 2.4mL 蒸馏水溶解备用, -20°C 保存 |
| 试剂三 | 液体 27mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂四 | 液体 4mL×1 瓶 | 4°C 保存 | 若凝固, 可在 25°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。 |
| 标准品 | 粉体 1mg×1 支 | 4°C 保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂。 |

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液枪、离心机、研钵。

四、乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 测定:

1、样本制备:

① 组织样本: 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌或细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞, 加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000 rpm, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或于水浴锅 (25°C) 孵育 15-30min 左右。

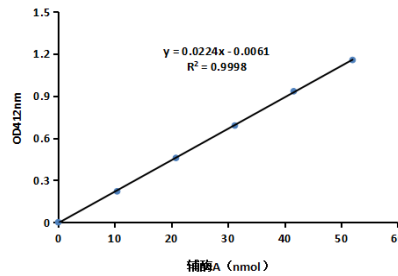
③ 在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-------------------|-----|-----|
| 样本 | 80 | 80 |
| 试剂一 | 40 | |
| 试剂二 | 40 | 40 |
| 试剂三 | 500 | 540 |
| 混匀, 37°C 孵育 30min | | |
| 试剂四 | 80 | 80 |

混匀，静置 5min，将所有液体转移至 1mL 比色皿中，于 412nm 处读取吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0224x - 0.0061$ ；x 为标准品摩尔质量（nmol），y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性(nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0061) \div 0.0224] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 18.6 \times (\Delta A + 0.0061) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性(nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0061) \div 0.0224] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 18.6 \times (\Delta A + 0.0061) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ChAT 活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0061) \div 0.0224] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 18.6 \times (\Delta A + 0.0061) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ChAT 活性(nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0061) \div 0.0224] \div V1 \div T \times D = 18.6 \times (\Delta A + 0.0061) \times D$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积（mL），0.08mL；

T---反应时间，30 min；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万； 辅酶 A 的分子量---Mr=767.53；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（2mg/mL）：用前甩几下使粉体落入底部，再加 0.5mL 蒸馏水溶解标准品（母液需在两天内用完且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/mL。
- 3 根据加样体系：80μL 标准品+580μL 试剂三+80μL 试剂四，于 412nm 处测定；根据结果即可制作标准曲线。